

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **60-028930**(43)Date of publication of application : **14.02.1985**

(51)Int.Cl.

A61K 35/12(21)Application number : **58-136793**(71)Applicant : **KOKEN KK****TAJIMA TOMOYUKI****NAGANUSHI YOUICHIROU**(22)Date of filing : **28.07.1983**(72)Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI****(54) PURIFICATION OF MULTIPLICATION INHIBITOR FOR MALIGNANT TUMOR CELL OF ANIMAL****(57)Abstract:**

PURPOSE: To purify the titled inhibitor, by removing a malignant tumor cell of animal from a culture cell of it, extracting the remaining medium with a specific solvent, evaporating it to dryness, collecting a solid substance.

CONSTITUTION: A malignant tumor cell of animal is multiplied in a medium for growing it until the medium becomes a saturated state, and it is then moved to a medium for extraction and cultivated. The medium is filtered by ultrafiltration to remove the malignant tumor cell, extracted with n-butanol, the extract is evaporated to dryness, and collected as a solid substance, so that a multiplication inhibitor for a malignant tumor cell of animal is purified. The inhibitor has an inhibitory effect with dose response on cell growth of established cell HRC derived from human kidney. The inhibitory effect on multiplication is considered to be unique to a cell derived from human tumor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 特許公報(B2)

平3-61648

⑬ Int. Cl.⁵

A 61 K 35/12

識別記号

ADU

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公告

平成3年(1991)9月20日

発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 人の癌由来細胞の増殖抑制剤の精製方法

⑯ 特 願 昭58-136793

⑰ 公 開 昭60-28930

⑱ 出 願 昭58(1983)7月28日

⑲ 昭60(1985)2月14日

⑳ 発 明 者 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15

\textcircled{21} 出 願 人 興 研 株 式 会 社 東京都千代田区四番町7番地

\textcircled{22} 出 願 人 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15

\textcircled{23} 出 願 人 長 主 陽 一 朗 神奈川県大和市中央3丁目9-4

\textcircled{24} 代 理 人 弁 理 士 竹 本 松 司 外1名

審 査 官 内 藤 伸 一

1

2

\textcircled{25} 特許請求の範囲

1 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を成長用培地で飽和状態になるまで培養し、次にこれを無血清の抽出培地に移し、抽出培養完了後、分子量 10^3 で分画して前記ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を除き、さらに凍結乾燥を行ったものをpH7~pH9でn-ブタノール抽出し、蒸発乾固することを特徴とする人の癌由来細胞の増殖抑制剤の精製方法。

発明の詳細な説明

この発明は、人の癌由来細胞の増殖抑制剤の精製方法に関する。

本出願人は、すでに動物の悪性腫瘍細胞の培養後培地より悪性腫瘍細胞を除いて抽出したものからなる動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤を特願昭57-143340号(特開昭59-33223号)として提供した。この悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、正常細胞に対して致死効果がなく、悪性腫瘍細胞に対して増殖抑制や致死効果を特異に有している。

この発明の目的は、より少ない投与量で人の癌由来細胞に対し、より著しい増殖抑制効果を有する増殖抑制剤を得るための精製方法を提供することにある。

本発明の人の癌由来細胞の増殖抑制剤の精製方法はヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を成長用培地で飽和状態になるまで培養した、次にこれを無血清の抽出培地に写し、抽出培養完了後、分子量 10^3

で分画して前記ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を除き、さらに凍結乾燥を行ったものをpH7~pH9でn-ブタノール抽出し、蒸発乾固することとを特徴とする。

5 この発明によれば、必要に応じて溶解して使用することのできる固型物とした人の癌由来細胞に対する増殖抑制剤を得ることができる。

そして、この発明により得られた悪性腫瘍細胞の増殖抑制剤は、ヒト腎由来樹立株細胞HRCの細胞増殖(cell growth)に対し、投薬反応(dose response)を持つ抑制効果を有している。また、形態的にも、ヒト腎由来樹立株細胞HRCに対する特徴的な形態変化が認められ、この発明により得られた物質は、ブタノールにより抽出されていることがわかる。なお、ヒト皮膚線維芽細胞に対しての効果は、今回のものではほとんど認められず、増殖抑制効果は、ヒト癌由来細胞に特有のものと考えられる。

(実施例 1)

1 使用した細胞

ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC

2 培養

まず、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを成長用培地にて培養器に飽和状態になるまで増殖し、次にこれを無血清の抽出培地に移し、抽出培養を行なった。

3 抽出

抽出培養完了後、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC を取除くため、分子量 10^3 で分画するフィルターを用いて限外濾過を行なった。次に凍結乾燥を行ない、さらに10倍濃度で再び溶解したものについて、*n*-ブタノール、ヘキサン及びメチルアセートによる有機溶媒で抽出を行なった。

抽出法は、等量抽出で1回行ない、培地の pH は、3, 7, 9 に設定した。なお、対照として未使用の培地に対し、同様の操作を行なった。

次に、実験群及び対照群の有機溶媒の抽出分画を 45° に加熱し、エヴァポレーターにて蒸発乾固させた。

次に実施例1の効果を確認するための実験について述べる。

1 人の癌由来細胞増殖抑制剤の検定法

この実験において、各抽出グループとも元の培地量に換算して60 μ l分について抽出を行ない、蒸発乾固して得たものを0.6 ml の Dimethyl Sulphoxide(DMSO) にて再び溶解し、各検定のグループにおいて、培地1.5 ml に対し、15 μ l ずつ投与した。また、対照群には同様の Dimethyl Sulphoxide(DMSO) のみ投与した。

増殖を検定する細胞はヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC を使い、24hole の多孔皿 (multi well plate) に 10^4 個植え込み、実験群の各々を10%新生仔牛血清を添加した Basal Medium Eagle (BME) に混合したものを培地として、一日おきに培地交換を行なった。こうして、凍結乾燥前の未処理抽出培地、*n*-ブタノール等による抽出を行なわない凍結乾燥後のもの、*n*-ブタノール抽出によるもので培地が pH 3 のもの、pH 5 のもの、pH 7 のもの、ヘキサン抽出によるもので培地が pH 3 のもの、pH 7 のもの、pH 9 のもの及びエチルアセート抽出群について、6日間培養しヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC 数を数えて生存率を調べた。

2 実験結果

前記実験結果を表1に示す。

(表 1)

		生存率 (%)	投与量 (ml)	回収率 (%)
未処理抽出培地		56	6	100
凍結乾燥後		62	6	86
<i>n</i> -ブタノール	PH3	104	0.06	—
	PH7	68	0.06	73
	PH9	64	0.06	82
ヘキサン	PH3	98	0.06	—
	PH7	103	0.06	—
	PH9	103	0.06	—
エチルアセート	PH3	100	0.06	—
	PH7	105	0.06	—
	PH9	97	0.06	—

以上のことにより、pH 7, 9 の *n*-ブタノール抽出分画に存在する物質は、未処理抽出培地より得られたものに比べ、百分の一の僅かな投与量で同様に人の癌由来細胞に対する増殖抑制効果を得ることができる。

なお、回収率は、100から生存率を引いて死亡率を求め、各実験群の死亡率を未処理抽出培地より得たものの死亡率で割った数の百分比である。このことから、増殖抑制効果力のある物質は、*n*-ブタノールに良く解けることがわかる。

3 *n*-ブタノール抽出物の効果の検定法

さらに、*n*-ブタノール抽出物の効果を確認するために、500 μ l の培地の pH を 7 及び 9 に設定し、*n*-ブタノールの溶媒の下で抽出を1回行ない、蒸発乾固させ、乾固したものを 2 ml の Dimethyl Sulphoxide(DMSO) にて再溶解して効果を調べた。なお、これは逆算すると 1 ml の培地に相当する DMSO 溶液は 4 μ l となる。

増殖を検定する細胞は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC を使い、直径 15 mm の多孔培養皿 (multi well culture dish) の一つの孔に対し、 10^4 個植え込む。培地は、10%新生仔牛血清添加の BME 1.5 ml を使い、24時間後に各種の濃度の DMSO 溶液を添加した 10%血清添加の BME と培地交換し、以後1日おきに同様の培地にて交換を

行ない、7～8日目に細胞数を数え、増殖を調べた。

4 対照群におけるDMSOの細胞増殖に及ぼす影響

* 対照群も実験群と同様に、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを10%新生仔牛血清添加のBMEにて培養した。

* この結果は表2に示される。

(表 2)

投与量(DMSO) $\mu\ell/ml$	0	2.0	4.0	8.0	16.0	20.0
細胞数 $\times 10^4$ sell/plat	32.69	33.87	32.29	32.63	18.64	9.80

5 ブタノール抽出物の細胞増殖に及ぼす影響

各投与群における7日目の細胞数を数え、DMSOを等量投与して対照群の細胞数に対する割合を生存率として百分比で算出した。

この結果を表3に示す。

(表 3)

投与量 $\mu\text{g}/\text{ml}$		2.0	4.0	8.0	16.0	20.0
原液に対する濃度化		1/2	1	2	4	5
生存率 (%)	PH7	103	95	85	64	57
	PH9	98	99	86	60	51

表2、表3及び図よりpH7及びpH9の培地にてブタノールを溶媒として抽出し、これを蒸発乾固して得られた固型物は、投与量が増すにつれ、人の癌由来細胞に対し増殖抑制効果が増大すること

15 かわかる。

図面の簡単な説明

図はブタノールの抽出物の細胞増殖に及ぼす影響を示したものである。

20

